Untersuchungen
über die Autoxydation von Merkaptanen.
Zugleich ein Beitrag zur chemischen Natur des Papains.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Philosophischen Fakultät

der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Willy Logemann

aus Hurrel (Oldenburg)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

MARBURG
Buchdruckerei Köster & Schell
1935

Als Dissertation angenommen am 21. Febr. 1934.
Berichterstatter: Professor Dr. H. MEERWEIN.
Tag der mündlichen Prüfung: 21. Febr. 1934.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Dem Andenken meines Vaters.

Meiner Mutter!

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Theoretischer Teil.

Das für die Lebensprozesse wichtigste Merkaptan ist das von Hopkins entdeckte Glutathion

$$\begin{array}{l} CH(NH_2)\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot CO\cdot NH\cdot CH\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH \\ \quad | \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\ \quad COOH \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad CH_2SH \end{array}$$

Waldschmidt-Leitz, Graßmann[1]) und Dickens[2]) haben gefunden, daß das Glutathion sowohl die proteolytischen Fermente der 3. Gruppe wie Kathepsin, Papain u. Bromelin, als auch die Methylglyoxalase, die Methylglyoxal in Milchsäure verwandelt, in den aktiven Zustand überführt.

Die Methylglyoxalase wird durch Jodessigsäure reversibel gehemmt. Der Aktivator, das Glutathion, wird durch Thioätherbildung gebunden, kann aber durch einen erneuten Zusatz von Merkaptan ersetzt werden.

Anders liegen die Verhältnisse beim Papain. Worauf hier die Aktivierung beruht, ist bis jetzt unbekannt gewesen. Es liegt nahe, zu vermuten, daß die Aktivierung dieses S-haltigen Enzyms durch Glutathion auf einer Reduktion von S-S-Gruppen zu SH-Gruppen beruht; denn die Disulfide werden durch Merkaptane[3]), aber auch durch Kaliumcyanid[4]) oder Blausäure, die gleichfalls aktivierend wirken, zu Thiolverbindungen reduziert:

$$RSSR + 2\ R'SH \rightarrow 2\ RSH + R'SSR'$$
$$RSSR + HCN \rightarrow RSH + NCSR.$$

Demnach würde bei der Aktivierung dieses Enzyms das Glutathion dem Wasserstofftransport dienen.

Um zu prüfen, ob die wechselseitige Aktivierung und Inaktivierung des Papains wirklich auf dem reversiblen Uebergang von Thiol- in Disulfid-Gruppen beruht, erschien es zweckmäßig, zunächst entsprechende Modellversuche an einfacheren Merkaptanen auszuführen.

Bersin[5]) hat gefunden, daß die Sauerstoffaufnahme alkalischer Lösungen von Thioglykolsäureanilid durch Monojodacetat stark beschleunigt wird.

---

1) Waldschmidt-Leitz, Naturwiss. 18, 644 (1930), Graßmann, Zeitschr. physiol. Chem. 186, 188 (1929)
2) Dickens, C. 1933, I, 2959.
3) Lecher, B 53, 591 (1920)
4) Mauthner, Ztschr. physiol. Chem. 78, 32 (1912)
5) Bersin, Biochem. Ztschr. 248, 4 (1932)

Bei der Wiederholung dieser Versuche und ihrer Uebertragung auf ein anderes Merkaptan, die α-Thiomilchsäure, hat dieser Effekt nicht reproduziert werden können. Es hat sich herausgestellt, daß in dem ursprünglich verwandten Thioglykolsäureanilid aus dem zur Darstellung verwandten selenhaltigen Ammoniumrhodanid Spuren von Selen enthalten gewesen sind. Selen oder Selenit beschleunigen nun die Autoxydation von Merkaptanen, wie Bersin[1]) hat zeigen können. Dieser Effekt wird durch Zusatz von Monojodacetat gewaltig gesteigert. (l. c.) Außer Selen und Selenit bewirken auch Tellur, Tellurit u. Tellurat eine Vergrößerung der Sauerstoffaufnahme bei Merkaptanen. Allerdings ist hier ein Zusatz von Monojodacetat wirkungslos.

Da über den Einfluß von Selen und Tellur und ihren Verbindungen auf die Sauerstoffaufnahme von Merkaptanen nichts bekannt war, habe ich versucht, den Mechanismus dieser Katalyse aufzuklären.

Die Einzelheiten dieser Untersuchung sind schon veröffentlicht[1]). Es sollen hier nur kurz die Resultate wiedergegeben werden.

Zunächst wurde festgestellt, daß die katalytische Beschleunigung der Sauerstoffaufnahme alkalischer Thiolactatlösungen durch elementares Selen größer ist, als durch Kupfer oder Arsen.

Bei der Autoxydation in Gegenwart von Selenit, Tellurit oder Tellurat entstehen vergängliche gelb gefärbte Verbindungen, deren Isolierung und Konstitutionsaufklärung an einigen Beispielen gelang. Es handelt sich um Seleno- und Telluromercaptide der Formel:

$$Se\ (SR)_2 \text{ und } Te\ (SR)_2$$

Telluromercaptide sind in der Literatur nicht beschrieben, während Selenomercaptide von Baroni[2]) durch Einwirkung von Selenoxychlorid auf Merkaptane oder Selen auf Disulfide dargestellt worden sind.

Ein Zusatz der durch Umsetzung von Tellurit mit Thiolactat dargestellten Tellurodithiodilactylsäure, $Te[SCH(CH_3)COOH]_2$ zu einer alkalischen Thiolactatlösung beschleunigte deren Autoxydation in gleicher Weise wie Tellurit.

Aehnlich wie die Geschwindigkeit der Autoxydation von Merkaptanen in Gegenwart von Metallen — z. B. Eisen oder Kupfer — stark vom pH der Lösung abhängig ist, wird auch die von Seleniten katalysierte Sauerstoffaufnahme von Thiomilchsäure von der Wasserstoffionenkonzentration beeinflußt. (Vgl. Abb. 1).

1) Bersin und Logemann, A. 505, 3 (1933)
2) Att R. Accad. Lincei (Roma) Rend. 9, 1019, (1929); 16, 515 (1932)

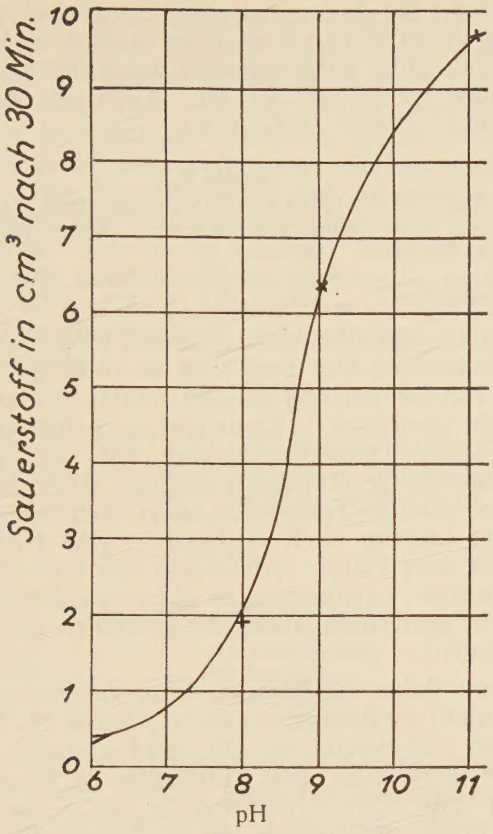


Abbildung 1

50 cm³ 0,05 mol. Na S CH (CH_3) COONa + 5×10^{-5} Mol Selenit
(Puffer: Borax-primäres Phosphat. pH=11 ohne Puffer)

Mit steigendem pH nimmt die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme stark zu, ähnlich wie es Wieland[1]) beim System Kupfer-Thioglykolsäure gefunden hat. Läßt man allerdings die Autoxydation in n-Natronlauge vor sich gehen, so tritt wieder eine Verlangsamung der Sauerstoffaufnahme ein. Während bei den bisherigen Versuchen die Thiomilchsäure nur in das Disulfid übergeht, wird hier die Disulfidstufe ohne erkennbaren Einschnitt in dem Sauerstoffverbrauch überschritten. (Vgl. Tabelle I)

Tabelle I.

Ansatz: 1|20 Mol|L NaSCH(CH_3)COONa+1|1000 Mol|L Na_2SeO_3+40 ccm n NaOH auf 50 ccm Flüssigkeit Temp. 21°; Druck 760 mm

Zeitabstände in Min.:	5	6	12	15	10	41	4	5	15	15
O_2-Aufnahme:	0,7	0,7	2,8	2,3	1,3	7,0	0,4	0,6	2,7	2,5
Gesamte O_2-Aufn.	0,7	1,4	4,2	6,5	7,8	14,0	14,4	15,0	17,7	20,2

1) Wieland, A. 464, 157 (1928)

Führt man die Autoxydationsversuche bei pH = 8 aus, so wird im Gegensatz zu den Versuchen in stark alkalischer Lösung kaum noch Sauerstoff aufgenommen, wenn das molare Verhältnis Thiomilchsäure zu Selenit 5:1 ist. Auch bei diesem Versuch fällt Selen aus. (Vergl. Tabelle II)

Tabelle II.

Ansatz: 1/10 Mol/L $NaSCH(CH_3)COONa$ + 1/50 Mol/L Na_2SeO_3 pH=8

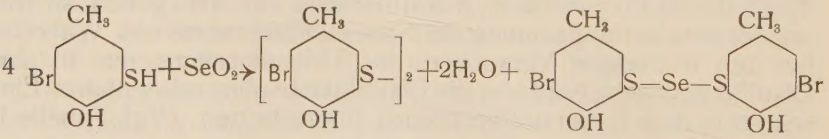
Ges. Vol. 25 ccm. Druck 760 mm, Temp. 21°.

Zeitabstände in Min.:	2	3	5	10	20	10
O_2-Aufnahme:	0,4	0,3	0,1	0,0	0,2	0,1
Gesamte O_2-Aufnahme:	0,4	0,7	0,8	0,8	1,0	1,1

Während das Reaktionsbild bei den Tellurverbindungen noch verhältnismäßig klar liegt[1]), ist es nicht gelungen, von der Einwirkung von Seleniten auf Thiomilchsäure ein einheitliches Bild zu gewinnen. Zwar tritt auch hier als Endprodukt der Autoxydation Dithiodilactylsäure auf; nur geht in stark alkalischer Lösung die Oxydation weiter. Aber das ausgefallene Selen löst sich nur zum Teil wieder auf; neben Seleniten entstehen in alkalischer Lösung auch Selenide und Polyselenide[2]) im Gegensatz zum Tellur. Außerdem läßt sich die der Tellurodithiodilactylsäure entsprechende Selenodithiodilactylsäure nur in schlechter Ausbeute gewinnen (17,3% berechnet auf Selendioxyd).

Man kann daher zweifeln, ob diese Verbindung das einzige Zwischenprodukt am Anfang der Autoxydation der Thiomilchsäure in Gegenwart von Selenit ist. In den Eigenschaften nimmt die Selenodithiodilactylsäure eine Mittelstellung zwischen der analogen Tellur- und Schwefelverbindung ein. Gegen Alkali ist sie nämlich etwas beständiger als die Tellurodithiodilactylsäure.

Zunächst gelang es nicht, die Selenodithiodilactylsäure zu isolieren. Um nun zu prüfen, ob Selenit und Merkaptan eine Selenodithio-Verbindung geben, habe ich ein anderes Merkaptan, das von Zincke[3]) dargestellte 2-Oxy-3-Brom-5-Methylthiophenol, in ätherischer Lösung mit Selendioxyd versetzt. Es entsteht das Seleno-2-Oxy-3-Brom-5-Methylthiophenolat.



Die Abscheidung des Selens und Tellurs bei der Reduktion von Seleniten und Telluriten durch Merkaptane ist eine Zeitreaktion. Die als Zwischenprodukte angenommenen Telluro-

1) Bersin und Logemann, A. 505. 3 (1933)
2) Calcagni, Gazz. Chim. Ital. 53, 1, 114 (1923)
3) Zincke, B. 44, 419 (1911)

dithiodilactylsäure und Selenodithiodilactylsäure oder deren Zerfallsprodukte geben langsam Selen oder Tellur ab. Die Ausfällungszeit ist weitgehend von der Stufe der Lösung abhängig, z. B. fällt aus einer 1|10 molaren Lösung von Thiomilchsäure, die 1|50 molar an telluriger Säure ist, bei pH = 8 nach 2 Min., bei pH = 10 nach 12 Sek. Tellur aus. Bei der Selenitreduktion treten noch einige Besonderheiten auf. Zunächst bleibt infolge der schon erwähnten Polyselenidbildung alles Selen bei einem pH Wert größer als 10 in Lösung; sodann unterbleibt die Selenabscheidung bei einem kleineren pH auch, wenn Halogenessigsäuren, wie Jod- und Bromessigsäure, die ein gelockertes Halogen besitzen, in bestimmten Konzentrationen hinzugefügt werden.

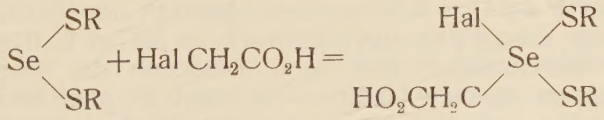
Tabelle III.

Zeitdauer der Selenausfällung.

Ansatz: 1/10 Mol pro Liter Thiomilchsäure + 1/50 Mol pro Liter Selenit. pH = 8 (Borax-Phosphat). Temp. = 18°. Gesamt-Vol. 25 ccm.

Nr.	Zusätze:	Zeit in Sekunden:
1	—	128
2	1/50 Mol pro Liter Jodessigsäure	keine Fällung
3	1/50 „ „ „ Bromessigsäure	„ „
4	1/50 „ „ „ Azidoessigsäure	103
5	1/50 „ „ „ Hydrochinon	keine Fällung
6	1/100 „ „ „ Jodessigsäure	330
7	1/100 „ „ „ Bromessigsäure	203

Da auch das Zwischenprodukt, die Selenodithiodilactylsäure, in Gegenwart dieser Säuren nicht zerfällt, liegt es nahe anzunehmen, daß die Stabilisierung auf ein nach folgender Gleichung gebildetes Selenetin zurückzuführen ist:



Diese Verbindung hat aber trotz vielfacher Versuche nicht isoliert werden können.

In analoger Weise verhindert Hydrochinon eine Ausfällung von Selen (Tab. III, Versuch 5). Da schon Verbindungen des Hydrochinons mit Schwefeldioxyd bekannt sind, wird auch wohl das Selendioxyd an das Hydrochinon gebunden und so vor der Reduktion durch Thiomilchsäure geschützt werden.

Die beschriebenen Modellversuche an der Thiomilchsäure geben eine Erklärung für die seit über 100 Jahren bekannte Reduktion von Tellurverbindungen durch lebende Zellen zu freiem Tellur. Schon Gosio[1]) hat vermutet, daß eine reduzierende

1) Gosio, Ztschr. f. Hygiene 51, 65 (1905)

Substanz in der Zelle dafür verantwortlich zu machen ist, die de Ray Pailhade[1]) aus verschiedenem biologischen Material isolieren konnte. Heute wissen wir, daß diese Substanz aus Glutathion bestanden hat.

In der Tat gibt eine wässerige Lösung von Glutathion (La Roche) mit telluriger und seleniger Säure dieselben Reaktionen wie Thiomilchsäure. Zunächst färbt sich die Lösung gelb (Merkaptidbildung), dann fällt nach Zusatz von Alkali Selen oder Tellur aus. Auch hier unterbleibt die Selenabscheidung, wenn man Monojodessigsäure hinzusetzt.

Als biologisches Beispiel ist der Schimmelpilz Penicillium crustaceum herangezogen worden. Auf einem glukosehaltigen Nährboden mit 26 mg-% Tellur (als Natriumtellurit) bildet er nach kurzer Zeit elementares Tellur, auf einem selenithaltigen Nährboden Selen. Genau so wie in den Modellversuchen unterbleibt in Gegenwart von Monojodessigsäure die Selenabscheidung. Dieselben Versuche kann man auch an Pflanzen[2]) ausführen. Stellt man abgeschnittene Blütenstengel von Viola tricolor einmal in Selenit-Lösung, das anderemal in eine Lösung von Selenit und Monojodessigsäure, so fällt Selen nur im ersten Falle aus. Aus diesen Versuchen könnte man auch einen mikrochemischen Nachweis von Glutathion im biologischen Material ableiten. Man prüft das Reduktionsvermögen gegenüber Selenit mit und ohne Zusatz von Monojodessigsäure. Fallen die Reaktionen wie oben beschrieben aus, dann darf man auf die Anwesenheit von Thiolverbindungen schließen.

Es wurde oben vermutet, daß das Papain im aktiven Zustand SH-Gruppen enthält. Die an den Autoxydationsversuchen gemachten Erfahrungen sind im folgenden zur Bestätigung dieser Anschauung herangezogen worden. —

Das Papain wird aus dem Milchsaft des Melonenbaumes (Carica papaya) durch Eintrocknen an der Luft gewonnen. Es ist überraschend, daß beim Trocknen die empfindlichen SH-Gruppen erhalten bleiben. Es scheinen aber im Rohenzym Antioxygene enthalten zu sein, die die Wirkung des Luftsauerstoffes herabsetzen. Maschmann[3]) hat gefunden, daß das Papain auch in Sauerstoff innerhalb kurzer Zeiträume nicht wesentlich verändert wird. Da man aber mit fortschreitender Reinigung die Antioxygene entfernt, wird das Enzym gegen oxydierende, bezw. dehydrierende Einflüsse immer empfindlicher. Aus diesen Gründen ist es auch nicht gelungen, mit Hilfe der von Willstätter an den Lyoenzymen ausgearbeiteten Reinigungsmethoden durch Adsorption und Elution eine wesentliche

1) de Ray Pailhade, C. r. 108, 356 (1889)
2) Vgl. die ausführlichen Untersuchungen über Selenabscheidung in Pflanzen von J. Stoklasa und Mitarbeitern: Biochem. Ztschr. 130, 604 (1922) und B. Turina, Biochem. Ztschr. 129, 507 (1922)
3) Maschmann und Helmert, Ztschr. physiol. Chem. 219, 104 (1933)

Aktivitätssteigerung zu erreichen; dagegen haben Willstätter[1]) das Papain durch Alkoholfällung, Kraut und Bauer[2]) durch Abscheidung begleitender Eiweißstoffe mit Ferrocyankalium oder Bleiphosphat anreichern können. Denselben Effekt kann man durch fraktionierte Fällungsmethoden erreichen[3]). Zur Bestimmung des erzielten Aktivitätsgrades werden die aus Gelatine als Substrat durch Hydrolyse freigelegten Karboxylgruppen mit alkoholischer Kalilauge nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz[4]) titriert. Im allgemeinen ist wie in den Arbeiten von Willstätter folgender Ansatz gewählt worden: 50 mg Papain, 2 g Gelatine und 10 ccm m/5 Dinatriumcitrat werden in einen 50 ccm Meßkolben gegeben, mit Wasser aufgefüllt und in einem Thermostaten auf 40° erwärmt. pH= 5. Zu Beginn und nach 1 Stunde werden 10 ccm herausgenommen und mit Thymolphthalein als Indikator titriert. Die Differenz dieser beiden Messungen, also die Hydrolyse in 1 Stunde, wird im folgenden als Spaltungsindex bezeichnet. Zunächst ist die fraktionierte Alkohol-Fällung angewandt worden. Man hat so den Vorteil, daß das alkohollösliche Glutathion, der natürliche Aktivator, im Filtrat bleibt.

Als Ausgangsmaterial habe ich das Merck'sche Papayotinum 1:350 genommen. Als erste Fraktion wird eine Substanz erhalten, die beim Stehen an der Luft eine honigartige Konsistenz annimmt und einen Spaltungsindex von 0,55 besitzt. Die zweite Fraktion enthält das reinere Produkt (Spaltungsindex 1,28), das in Gegenwart von Glutathion einen Spaltungsindex von 2,07 zeigt.

Ein aktives, aktivatorfreies Präparat wird erhalten, wenn die Fraktion II, die sicher noch inaktives Disulfid enthält, mit Schwefelwasserstoff reduziert und mit Alkohol ausgefällt wird (Spaltungsindex 1,5). Ungefähr dieselben Reinheitsgrade erreicht man durch Fällung mit Ammonsulfat. Bei einer Sättigung von 50 % fällt ein flockiger Niederschlag aus, der einen Spaltungsindex von 1,3 besitzt. Eine wesentliche Aktivierung dieses Präparates mit Glutathion ist nicht möglich gewesen (Spaltungsindex 1,4).

Die reinsten Papainpräparate, die so erhalten werden, zeigen deutliche Eiweißreaktionen (vgl. Kraut, l. c.). So fallen die Ninhydrinreaktion, die Paulysche Diazoreaktion, die Reaktion von Sakaguschi auf Arginin, die Biuretreaktion, der Schwefelnachweis und die Xanthoprotein-Reaktion positiv aus. Vom Papain möchte ich daher annehmen, daß es zur Gruppe der Eiweißkörper gehört.

Einige der wichtigsten Beobachtungen über die Einwirkung von Aktivatoren, Paralysatoren und Destruktoren auf aktivator-

1) Willstätter, Ztschr. f. physiol. Chem. **138**, 124 (1924)
2) Kraut und Bauer, Ztschr. physiol. Chem. **164**, 10 (1924)
3) Bersin, Ztschr. f. physiol. Chem. **222**, 177 (1933)
4) Willstätter u. Waldschmidt-Leitz, Ztschr. physiol. Chem. **251**, 290 (1926)

freies Papain sind inzwischen veröffentlicht worden[1]), sie seien daher an dieser Stelle nur kurz zusammengefaßt.

Es ergab sich, daß das durch Monojodacetet vergiftete Enzym nicht durch Glutathion reaktivierbar ist. Daher muß ein Eingriff (Thioätherbildung) in die prosthetische Gruppe des Papains angenommen werden.

Weiter wurden Schädigungen durch Selenit, Selenit und Monojodacetat, Diazomethan, Jod, Chinon und Monobromacetat beobachtet.

Durch Hydroperoxyd inaktiviertes Papain konnte durch Reduktionsmittel wie Schwefelwasserstoff, Sulfit, Glutathion sowie Succinodehydrase und Succinat reaktiviert werden.

Alle diese Versuche machen die Annahme sehr wahrscheinlich, daß im aktivierten Papain eine SH-Gruppe vorhanden ist. Denn Verbindungen, die Merkaptane oxydieren, schädigen das Enzym. Diese Schädigung ist irreversibel bei der Behandlung mit Selenit, Chinon und Jod, dagegen reversibel bei der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd. Stoffe, die Disulfide zu Merkaptanen reduzieren, können auch das mit Wasserstoffsuperoxyd vergiftete Enzym reaktivieren, z. B.: Schwefelwasserstoff, Merkaptane, Sulfite und Dehydrasen in Gegenwart eines Wasserstoff-Donators.

Auch die von anderer Seite beobachtete Inaktivierung des Papains durch Schwermetalle dürfte auf eine Beschleunigung der Oxydation der SH-Gruppen im Enzym zurückzuführen sein[2]).

Versuchsteil.*

I. Versuche über die Autoxydation von Thiomilchsäure.

a) Apparatur.

Die Messungen werden in einem Schütteltherm ostaten ausgeführt, wie ihn Bersin[3]) beschrieben hat. Als Reaktionsgefäß dient ein Kolben mit einem seitlichen Ansatz ähnlich wie er auch bei der Bestimmung des aktiven Wasserstoffes nach Zerewitinoff benutzt wird. Das Gefäß steht mit einem Lunge-schen Nitrometer in Verbindung, in dem sich als Sperrflüssigkeit Brodie-sche Lösung befindet. Die Temperatur des Wasserbades beträgt bei allen Versuchen 21°; die Gasvolumina sind auf 0° und 760 mm reduziert. In den seitlichen Ansatz des

1) Bersin und Logemann, Ztschr f. physiol. Chem. **220**, 209 (1933)
2) Versuche über Schwermetallvergiftungen des Papains. Vgl. Krebs, Biochem. Ztschr. **220**, 289 (1930); Graßmann und Mitarbeiter, Ztschr. physiol. Chem. **186**, 183 (1930) und **194**, 124 (1931)
3) Bersin, Biochem. Ztschr. **249**, 466 (1932)

*) Ein großer Teil der Versuche ist in den schon zilierten Arbeiten (A. 505, 1 (1933) und Ztschr. physiol. Chem. 220, 209 (1933) veröffentlicht. Er ist hier nicht wieder angeführt worden.

Reaktionsgefäßes wird Thiomilchsäure eingefüllt. Nach dem Austemperieren, Evakuieren und Füllen mit Sauerstoff, wird durch Neigen des Gefäßes das Merkaptan mit der Alkalilösung und den beschriebenen Zusätzen im Kolben vermischt. Das Gesamtvolumen der Reaktionslösung beträgt 25 oder 50 ccm einer genau 1/10 molaren oder etwa 1-%ig. Thiolactat-Lösung.

b) Darstellung von Selenodithiodilactylsäure.
$Se[SCH(CH_3)COOH]_2$

Man löst 1,1 g Selendioxyd (1/100 Mol) in ca. 50 ccm NaOH auf und fügt 400 ccm Wasser hinzu. Zu dieser Lösung gibt man unter lebhaftem Rühren 5 g Thiomilchsäure (1/20 Mol) in 50 ccm Wasser. Nach ungefähr 30 Sek. tritt eine deutliche Gelbfärbung auf.. In diesem Augenblick säuert man mit 25 ccm 2 n-Schwefelsäure an und äthert 2—3 mal aus. Es darf sich kein Selen ausscheiden. Der Aether wird bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum abgesogen und das zurückbleibende Oel unter Stickstoff eingeschmolzen. Man kann auch durch Schütteln mit Petroläther die überschüssige Thiomilchsäure vorher entfernen. Nach 4 Wochen scheiden sich im Dunkeln im Eisschrank ca. 0,5 g Selenodithiodilactylsäure aus, die man mit Petroläther vom anhaftenden Oel befreien kann.

Schmp. 104—105°. Die Substanz ist in Wasser, Dioxan, Alkohol und Chloroform leicht löslich, schwerer in Schwefelkohlenstoff und Benzol und unlöslich in Petroläther.

0,1460 g Sbst.: 10,09 ccm 1/10 n NaOH
Aequiv. Gew. ber.: 144,7; gef.: 144,7
0,1928 g Sbst.: 0,0526 g Selen.
$C_6H_{10}O_4S_2Se$ ber. Se.: 27,37: gef. Se.: 27,28

Zur Selenbestimmung wird die Substanz nach Carius aufgeschlossen. Nach dem Neutralisieren mit 10%ig. Ammoniak und schwachem Ansäuern mit 2 n-Salzsäure wird das Selen mit Hydrazin gefällt. Mit einem Tropfen 2 n-Natronlauge zersetzt sich die Selenodithiodilaktylsäure nach kurzer Zeit unter Abscheidung von rotem Selen. Diese Zersetzung unterbleibt in Gegenwart von Monojodacetat oder Monobromacetat.

II. Versuche mit Papain.

a) Die Reinigung des Enzyms.

1. Die Reinigung durch fraktionierte Alkoholfällung.

10 g Papayotin (Merck 1 : 350) werden unter Schütteln und schwachem Erwärmen in einem Wasserbad von 30° in 150 ccm Wasser gelöst. Es bleibt ein Rückstand, der abzentrifugiert und verworfen wird. Die klare Lösung wird mit 180 ccm, 95%ig. Alkohol in kleinen Portionen gefällt. Der klebrige Niederschlag ballt sich leicht zusammen und färbt sich rasch braungelb. Nach dem Trocknen über konzentrierter Schwefelsäure läßt er sich

aber fein pulverisieren (Fraktion I). Durch weitere 500 ccm 95 %ig. Alkohol wird das Papain vollständig gefällt (Fraktion II). Die zweite Fraktion ist rein weiß und wird im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute: 1,5 g.

Fraktion:	Spaltungsindex:
I	0,55
II	1,28
II + 1/250. Mol/L Glutathion	2,07

2. Die Reinigung durch fraktionierte Ammonsulfat-Fällung.

10 g Papayotin (Merck 1 : 350) werden mit Tetrachlorkohlenstoff geschüttelt. Es wird hierdurch ein wachsartiger Körper extrahiert. Das zurückbleibende Enzym wird abgesogen und an der Luft getrocknet. Das so gewonnene Enzympräparat wird in Wasser gelöst und mit so viel Alkohol tropfenweise gefällt, bis der Niederschlag nicht mehr klebrig ist. Dann wird mit Alkohol vollständig ausgefällt und dieses Produkt mit Ammonsulfatlösung fraktioniert.

Eine Lösung von 1,2 g des obigen Papains in 30 ccm Wasser wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Der entstehende Niederschlag wird zentrifugiert (Fraktion I). Bei weiterem Zusatz von Ammonsulfatlösung fällt noch ein geringer Niederschlag aus (Fraktion II).

Fraktion:	Spaltungsindex:
Alkoholfällung	0,79
I	1,3
I + 1/250. Mol/L Glutathion	1,4
II	0,39

3. Die Anreicherung des Papains mit Hilfe von Reduktionsmitteln.

In eine Lösung von 1 g Papain (Fraktion II der Alkoholfällung nach 2) in 30 ccm Wasser wird 25 Min. lang Schwefelwasserstoff eingeleitet (der Schwefelwasserstoff ist aus Natriumsulfid, reinst Kahlbaum, und 2 n-Schwefelsäure hergestellt worden). Die Lösung trübt sich. (Schwefel). Zunächst werden 10 ccm Alkohol zugesetzt und der Niederschlag zentrifugiert. Aus der klaren Lösung fällt das Papain mit 50 ccm absolutem Alkohol vollständig aus. Das Präparat wird im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Präparat:	Spaltungsindex:
2. Alkoholfällung	0,79
nach Reduktion mit H_2S	1,5

Versuche, als Reduktionsmittel Thioglykolsäure zu verwenden, haben keinen Erfolg gehabt, da dieses Merkaptan von dem Papain hartnäckig festgehalten wird und nicht mit Alkohol herausgewaschen werden kann. Ebenso erfolglos sind Versuche gewesen, das Papain in krystallisiertem Zustande zu erhalten. Wenn man die Ammonsulfatfällung in Wasser löst, wieder mit Ammonsulfat versetzt bis zur deutlichen Trübung und auf 40° erwärmt, so scheiden sich beim langsamen Abkühlen in einer Thermosflasche Plättchen mit unregelmäßig abgebrochenen Kanten aus, an denen keine Kristallstruktur festzustellen ist.

b) Die Schwefelbestimmung im Papain.

Zur Schwefelbestimmung ist die zweite Alkoholfraktion mit einem Spaltungsindex von 1,28 nach Carius aufgeschlossen worden.

0,2052 g Sbst.: 0,0514 g $BaSO_4$ gef.: S 3,4 %

c) Die Inaktivierungsversuche.

Das für die Inaktivierungsversuche angewandte Papain ist aus dem Roh-Enzym durch Fällung mit Alkohol gewonnen worden. Die Aktivität der so erhaltenen Präparate schwankt etwas, so daß zu den einzelnen Versuchsreihen stets ein und dieselbe Enzymprobe mit bekanntem Spaltungsindex benutzt worden ist. Die einzelnen Versuche werden in Meßkölbchen, die sich in einem elektrisch geheizten Rührthermostaten mit Röhrenrelais befinden, bei einer Temp. von 40° ausgeführt. Die Proben sind folgendermaßen angesetzt: 45 mg Papain + 10 ccm $^m/_5$ Dinatriumcitrat und 30 ccm Gelatinelösung (= 2 g Gelatine) werden mit den beschriebenen Zusätzen (s. Theor. Teil) auf 50 ccm aufgefüllt. pH= 5. Am Anfang und nach 1 Stunde werden 10 ccm entnommen und nach der Vorschrift von Willstätter und Mitarbeiter (l. c.) in 90 %ig. alkoholischer Lösung mit n/5-Kalilauge in 90 %ig. Alkohol mit Thymolphthalein als Indikator titriert.

1. Die Herstellung von oxydiertem Papain.

Eine Lösung von 5 g Rohpapain in 150 ccm Wasser wird mit 3,3 ccm 30 %ig. Wasserstoffsuperoxyd 20 Min. lang auf 30° erwärmt und nach dem Erkalten mit 700 ccm 95 %ig. Alkohol gefällt, der Niederschlag abzentrifugiert und im Vakuum über Calciumchlorid getrocknet. Dieses Präparat ist, wie schon beschrieben, reversibel inaktiviert.

2. Reduktionsversuche mit Schwefelwasserstoff.

Man läßt auf 50 mg Papain, in 10 ccm Pufferlösung gelöst, 5 Min. lang 0,0034 g H_2O_2 bei 40° einwirken. Die Lösung des so erhaltenen inaktiven Papains wird 10 Min. lang bei Zimmertemp. mit Schwefelwasserstoff behandelt. Der Ueberschuß an Reduktionsmittel wird durch Durchleiten von Stickstoff bis zum Verschwinden der Reaktion mit Nitroprussidnatrium verjagt und nach Zusatz des Substrates der Spaltungsindex wie üblich bestimmt.

3. Enzymatische Reduktionsversuche.

Die Versuche zur enzymatischen Reduktion des oxydierten Papains sind wie folgt angestellt: 45 mg oxydiertes Papain (Spaltungsindex 0,09) werden mit 9 ccm einer Lösung von Rindermuskeldehydrase (Herstellung nach Rona, Fermentmethoden 1931, S. 383) nach Zusatz von 50 mg Kaliumsuccinat 1 Stunde bei 40° behandelt, dann werden 30 ccm Gelatinelösung (= 2 g Gelatine) zugegeben, und es wird mit Salzsäure ein pH = 5 hergestellt (Indikator: Methylrot).

In einem zweiten Versuch ist die Wasserstoffübertragung bei 23° 6 Stunden lang fortgesetzt worden.

Die vorliegende Arbeit wurde im chemischen Institut der Universität Marburg im Sommersemester 1932 begonnen und im Anfang des Wintersemesters 1933|34 abgeschlossen.

Meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Dr. Th. Bersin,

unter dessen Leitung die Arbeit entstand, bin ich für die vielseitige Förderung und mannigfache Unterstützung mit Rat und Tat zu großem Dank verpflichtet.

Außerdem sei es mir gestattet, Herrn Professor Dr. **H. Meerwein** für sein liebenswürdiges Interesse und das jederzeit bewiesene Wohlwollen meinen ehrerbietigsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Am 8. Januar 1909 wurde ich, Willy Bernhard Logemann, als Sohn des Rektors Johann Logemann und seiner Ehefrau Sophie, geborene Schulenberg, zu Hurrel bei Oldenburg geboren. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit und bin protestantischer Konfession.

Nach Besuch der Volksschulen in Donnerschwee und Bürgeresch kam ich Ostern 1919 auf das Humanistische Gymnasium zu Oldenburg, das ich Ostern 1928 mit dem Reifezeugnis verließ.

Vom Sommersemester 1928 an bis zum Wintersemester 1933|34 studierte ich an der Universität in Marburg Chemie. Das erste Verbandsexamen bestand ich am 25. November 1930, das zweite Verbandsexamen am 19. April 1932, und das Rigorosum am 21. Februar 1934. Anschließend war ich Liebigassistent am chemischen Institut der Universität Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren: v. Auwers, Baars, Bersin, Claußen, Dittler, Grüneisen, Kutscher, Krollpfeiffer, Meerwein, Neumann, Strecker, Thiel, Tomaschek und Wittig.

Ihnen allen sage ich für meine Ausbildung meinen herzlichsten Dank.